Aus dem Hygiene-Institut der Universität Basel
Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. J. Tomcsik

Wirkung verschiedener Alkohole auf das Cytoplasma einer Bacillus-Spezies

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der gesamten Heilkunde
der medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Regula Baumgartner-Morf

von Basel

1963

19 65

VERLAG VON S. KARGER IN BASEL

Von der Medizinischen Fakultät Basel genehmigt
auf Antrag von Prof. Dr. *J. Tomcsik*

Tag der Promotion: 19. Juni 1963

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Sonderdruck aus «*Pathologia et Microbiologia*» Vol. 28, No. 2 (1965)

Zur Prüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln bestehen zahlreiche, anerkannte in vitro- und in vivo-Methoden (*Reddisch* 1957; *Sykes* 1958).

Über Wirkungsmechanismen, die bei der Desinfektion eine Rolle spielen, ist jedoch relativ wenig bekannt. Die zur Abklärung dieses komplexen Problems verwendeten Methoden erfassen je nur einzelne Faktoren. Am zahlreichsten sind biochemisch-enzymologische Untersuchungen, die den Zusammenhang zwischen der Aktivität einzelner Enzyme und Lebens-, resp. Teilungsfähigkeit der Bakterien prüfen (*Rahn und Van Eseltine* 1947; *Knox* et al. 1949; *Robertson und Oliver* 1954; *Stedman* et al. 1957; *Hugo* 1957). — In wenigen Arbeiten wurden biochemische mit morphologischen, v. a. elektronenoptischen Studien kombiniert (*Dyar* 1947; *Gale und Taylor* 1947; *Mitchell und Crowe* 1947; *Salton* et al. 1951; *Salton* 1951; *Zapf* 1961).

Tomcsik (1955) zeigte einen neuen, morphologischen Weg zur Abklärung der Wirkungsweise antibakterieller Substanzen. Er beruht auf früheren Beobachtungen über die Änderung der Bakterien-Zellstruktur im Verlauf von Lysozym-Einwirkung (*Tomcsik und Guex-Holzer,* 1952). Diese Autoren stellten im Phasenkontrastmikroskop fest, daß ein lebender, mit Fixationsmitteln nicht vorbehandelter Bacillus M (ein dem Bac. megatherium verwandter Stamm) nach Abbau der Zellwand durch Lysozym eine kugelige Gestalt annimmt. Zu Beginn der Lysozym-Einwirkung dilatiert sich die Zellwand, was eine Ablösung von der Protoplasmamembran, zunächst an den Zellpolen, dann auch an den Längsseiten zur Folge hat. Selbst die enzymatisch partiell abgebaute Zellwand konnte durch Zellwandantikörper sichtbar gemacht wer-

Eingegangen: 30. 4. 1964.

den. Nach fortgeschrittener Auflösung der Zellwand nimmt das von der Protoplasmamembran begrenzte Protoplasma, gemäß der geringsten Oberflächenspannung, kugelige Gestalt an. *Weibull* (1953) zeigte, daß diese phasenoptisch dunkel erscheinenden Protoplasmakugeln (von ihm als Protoplasten bezeichnet) in hypertonischer, gepufferter Saccharoselösung unverändert bleiben und ebensoviel O_2 aufnehmen wie intakte Zellen.

Wird Bac. megatherium durch Hitze abgetötet, d. h. die Protoplasmaproteine koaguliert, so wird das Protoplasma in seiner ursprünglichen, d. h. Stäbchenform fixiert, und nach Zellwandabbau entstehen kurze Protoplasmastäbchen (*Tomcsik und Guex-Holzer* 1952). Solche Stäbchen («small bacilli» wurden bereits von *Welshimer und Robinow* (1949) in ihren Studien über Lysozym-Wirkung an Formol-fixierten Bac. megatherium beobachtet und später als geschrumpfte, zellwandfreie Protoplasten interpretiert. *Salton* (1953) bestätigte dieses Phänomen in elektronenoptischen Untersuchungen an Hitze-fixiertem, mit Lysozym behandeltem Bac. megatherium.

Tomcsik (1955) schloß aus diesen Versuchen, daß die sphärische Transformation des Protoplasmas beim Lysozym-empfindlichen Bac. megatherium ein Zeichen seiner Intaktheit ist, und prüfte den Effekt einiger Antiseptica (Phenol, Bradosol, Desogen, Kaliumpermanganat, Hg-Verbindungen etc.) auf das Protoplastenbildungsvermögen von Bacillus M.

In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Alkohole hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Protoplasma von Bacillus M mit der von *Tomcsik* (1955) angegebenen Methode (im folgenden als «Lysozym-Methode» bezeichnet) untersucht. Aus dem Vergleich dieser Ergebnisse mit denjenigen aus der einfachen Wachstums-, bzw. Überlebenskontrolle soll geprüft werden, ob die «Lysozym-Methode» bei der Beurteilung der antibakteriellen Wirkung der Alkohole gewisse Vorteile bietet. Ferner wird versucht, mit Hilfe dieser Methode auch etwas über die Wirkungsmechanismen der Alkohole auszusagen.

Material und Methoden

Bacillus M: Bac. M wurde zu allen unseren Experimenten benützt. Der Stamm wurde im Laufe von Versuchen über induzierte Mutation des Bac. anthracis isoliert und steht morphologisch dem Bac. megatherium nahe (*Tomcsik,* 1949, 1950).

Alkohole: Methyl-, Aethyl- («Alcohol absolutus», ca. 99,46 Vol.%, und «Spiritus», ca. 95 Vol.%), n-Propyl-, Isopropyl-, n-Butyl-, n-Amyl- und n-Octyl-Alkohol. Die Verdünnungen wurden mit Hilfe des spez. Gewichtes eingestellt.

Phasenkontrastsystem: Auf das Laborlux-Mikroskop (Leitz) wurden ein kombinierter Hellfeld-Dunkelfeld Phasenkontrastkondensor und ein Phasenkontrastobjektiv (90×) montiert.

Behandlung von Bac. M mit Alkohol:

Bac. M wurde auf Nähragar in Kolle-Flaschen 15—20 Std. bei 28° C bebrütet. Auswaschen der Kulturen und Suspension in sterilem aqua dest. Die Suspensionsdichte wurde entsprechend Röhrchen Nr. 6 der $BaSO_4$-Trübungsröhrchen nach McFarland eingestellt. Von dieser Suspendierung wurden je 4 ml in sterile Zentrifugiergläschen abgefüllt und bei Zimmertemp. 10 Min. zentrifugiert (2850 U/Min.). Nach Abgießen der überstehenden Flüssigkeit wurden je 4 ml des zu prüfenden Alkohols in verschiedenen Konzentrationen zu dem Bakterien-Sediment gegeben, und das Röhrchen, um eine Verklumpung der Bakterien zu verhindern, tüchtig geschüttelt. Die Inkubation der Bakterien mit dem Alkohol erfolgte bei Zimmertemp. und dauerte je nach Versuch 5 Min. bis maximal 24 Std. Darauf wurden die Röhrchen wiederum zentrifugiert, und der Alkohol anschließend abgeschüttet. Durch einen einmaligen Waschprozeß und Resuspension der Bakterien in 4 ml Ringer-, resp. 0,2 molarer gepufferter Saccharoselösung (*Weibull,* 1953) konnte der noch im Bakterienbodensatz verbliebene Alkohol genügend entfernt, d. h. bis zu einer minimalen, unwirksamen Konzentration verdünnt werden. Als Kontrolle diente die gleiche Bac. M-Suspension, der steriles aqua dest. anstelle von Alkohol zugesetzt wurde. Alle Versuche wurden in doppelter Reihe 4—10mal durchgeführt.

Prüfung der Alkohol-Wirksamkeit:

1. Wachstums-Kontrolle: Von jedem Röhrchen wurden 3—4 Nähragarplatten durch Ausspateln von je 0,1—0,2 ml der Bakteriensuspension beimpft und bei 28° C. 3 Tage bebrütet.

2. Phasenoptische Betrachtung von Bac. M vor und nach Lysozym-Zugabe («Lysozym-Methode»): Ideal für die phasenoptische Betrachtung ist eine solche Suspensionsdichte, die pro Gesichtsfeld ca. 20 Bakterien, resp. zellwandfreie Protoplasten ergibt. — Die eine Hälfte der Bakteriensuspension wurde ohne weitere Behandlung im Phasenkontrastmikroskop untersucht, die andere mit Lysozym versehen (Lysozym 3× kristallisiert, lyophilisiert [Mann], ca. 8000 Einheiten/mg; Gebrauchsverdünnung: 25—50 Gamma/ml). Nach Einwirkenlassen von Lysozym (ca. 15 Min. bei Zimmertemp.) brachte man mittels einer Kapillarpipette einen Tropfen der Suspension auf einen entfetteten Objektträger und deckte ihn mit einem Deckgläschen. Von jedem Röhrchen wurden mehrere Präparate zu verschiedenen Zeitpunkten angefertigt, im Phasenkontrastmikroskop angesehen (mehrere Gesichtsfelder, entsprechend ca. 200 Zellelementen durchgemustert) und beurteilt. Um über vergleichbare Beobachtungen zu verfügen, sollte die mikroskopische Untersuchung 1—2 Std. nach Lysozym-Zugabe beendet werden, denn nach längerer Aufbewahrung in Ringer-, wie auch in hypertonischer, gepufferter Saccharoselösung werden

intakte, phasenoptisch volle Protoplasmakugeln zu phasenoptisch leeren Kugeln, welche ihrerseits nach wenigen Stunden durch Platzen ebenfalls zugrunde gehen.

Ergebnisse

Zur Illustration der mit unserer Methode erfaßbaren Alkoholwirkung sei ein typisches Beispiel an den Anfang gestellt: Inkubation von Bac. M mit einer Verdünnungsreihe von Aethyl-Alkohol während ½ Std.

% Alkohol	99,5	95	90 - 70	60	50	40	30	20
Wachstums-kontrolle auf Agar	—	—	—	—	—	—	80 Kolonien	Bakterien-Rasen
phasenoptischer Befund nach Zellwandabbau durch Lysozym								
Bewertung wie in Abb. 2	6	6	6	5	4	3,5	2	0 - 1

Abb. 1. Lysozym-Behandlung von Bac. M nach ½stündiger Inkubation mit Aethyl-Alkohol.

Geschrumpfte Protoplasmastäbchen.

Stäbchen mit granuliertem Protoplasma.

Phasenoptisch leere Protoplasmakugeln.

Intakte, phasenoptisch volle Protoplasmakugeln («Protoplasten»).

Zelltrümmer.

Die mikroskopischen Befunde sind mit Punktzahlen von 0—6 beurteilt, wobei 0 fehlender Alkoholwirkung, 6 optimaler Wirkung entspricht.

Wie Abb. 1 zeigt, manifestiert sich die Abtötung der Bakterien 1. in ausbleibendem Wachstum, 2. im phasenoptischen Bild nach Abbau der Zellwand durch Lysozym: geschrumpfte, meist dunkle Protoplasmastäbchen (Abb. 10). Besonders in älteren Kulturen sind neben den dunklen Stäbchen mit phasenoptisch homogenem Cytoplasma auch hellere Stäbchen mit körnigem Cytoplasma zu beobachten. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Bakterien, die bereits vor der Alkohol-Einwirkung abgestorben sind.

Niedrige Alkoholkonzentrationen (20%) töten die Bakterien nicht ab; es tritt gutes Wachstum auf (Kolonie-Rasen), und nach Lysozymbehandlung entstehen durch sphärische Transformation des Protoplasmas phasenoptisch dunkle, volle Protoplasmakugeln (Abb. 8), sogenannte *Protoplasten* (Definition durch *Brenner* et al. 1958, und *McQuillen* 1960: sphärische Strukturen, die bei der Entfernung der gesamten Zellwand von einer vegetativen Zelle entstehen).

Auffallend ist die Tatsache, daß wir bei etwas höheren Alkoholkonzentrationen (40–60%), die bereits kein Wachstum mehr erlauben (vgl. Abb. 1) nach Lysozym im Phasenkontrastmikroskop nicht nur geschrumpfte Protoplasmastäbchen beobachten (wie bei 70- und höher prozentigem Alkohol), sondern auch phasenoptisch leere, helle, von der Protoplasmamembran begrenzte Kugeln (Abb. 9). An der Protoplasmamembran haften meist einige dunkle Körnchen, wahrscheinlich Lipoidgranula (*Weibull* 1953).

Vergleich der Wirkung verschiedener Alkohole

Die Prüfung verschiedener Alkohole erfolgte obigem Beispiel entsprechend. Abb. 2 und 3 zeigen die Wirkung von *Methyl-, Aethyl-, n-Propyl- und Isopropyl-Alkohol* bei 5-minütiger Inkubationsdauer (Abb. 2 und 3). — Unsere Versuche ergeben keinen qualitativen Wirkungsunterschied zwischen den geprüften Alkoholen: es treten dieselben morphologischen Formen auf. Jedoch ist die für die Abtötung der Bakterien benötigte Konzentration verschieden: Propylalkohol verursacht bereits in 30%iger Konzentration bei allen vorhandenen Bakterien die Bildung geschrumpfter Protoplasmastäbchen, Isopropylalkohol bei 50%, Aethylalkohol erst bei 60% und Methylalkohol bei 70%. Bei Propylalkohol 5%, Isopropylalkohol 10%, Aethylalkohol 15%, Methylalkohol 20% sind ausschließlich phasenoptisch volle Protoplasmakugeln (Protoplasten) festzustellen.

Das Wachstum auf Agar (vgl. Abb. 3) geht den phasenoptischen Befunden einigermaßen parallel. Die Konzentrationen für optimales Wachstum sind identisch mit denen, bei welchen ausschließlich intakte Protoplasmakugeln entstehen, jedoch ist bei den Konzentrationen, die das Wachstum gerade vollständig hemmen, bei der phasenoptischen Beurteilung noch keine maximale Alkoholwirkung feststellbar.

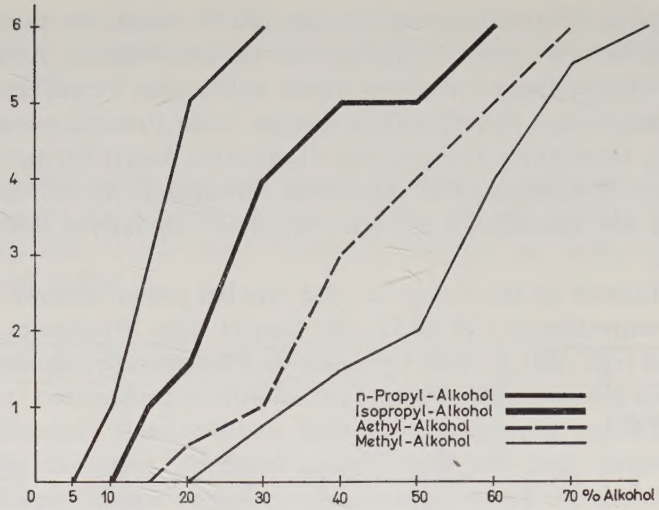


Abb. 2. Vergleich der Wirkung verschiedener Alkohole auf die Protoplastenbildung von Bac. M (5minutige Inkubation). Ordinate: Bewertung der phasenoptischen Befunde am zellwandfreien Bac. M (vgl. auch Abb. 1). 0: nur intakte, dunkle, volle Kugeln (= Protoplasten); entspricht fehlender Alkoholwirkung. 1: selten 1 Stäbchen, etwas mehr intakte Protoplasten als helle, leere, von der Protoplasmamembran begrenzte Kugeln. 2: Anzahl der Stäbchen geringer als Anzahl der kugeligen Formen (gleichviele volle wie leere Kugeln). 3: Anzahl der Stäbchen = Anzahl der kugeligen Formen (mehr leere als volle Kugeln). 4: Anzahl der Stäbchen größer als Anzahl der kugeligen Formen (volle Kugeln selten). 5: erstes Auftreten kugeliger Formen (leere Kugeln, keine vollen). 6: nur Stäbchen, kurz, dunkel, ab und zu hellere Stäbchen mit körnigem Protoplasma: entspricht optimaler Alkoholwirkung.

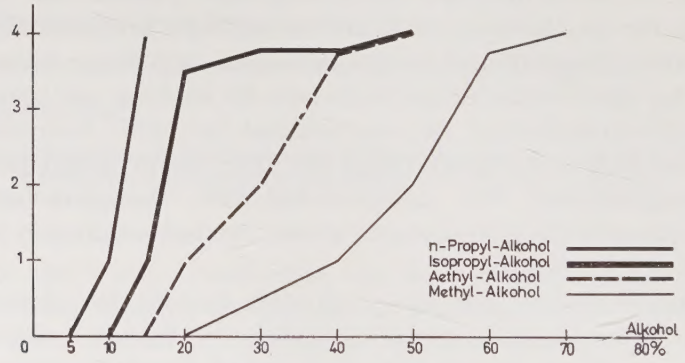


Abb. 3. Wachstumskontrolle auf Nähragar nach 5minütiger Einwirkung verschiedener Alkohole auf Bac. M. Ordinate: Beurteilung des Wachstums. 0: keine Wachstumshemmung (fehlende Alkoholwirkung), Bakterienrasen. 1: mehr als 1000 Kolonien pro Platte. 2: 100—1000 Kolonien. 3: 1—100 Kolonien. 4: vollständige Wachstumshemmung (kein Wachstum), entspricht optimaler Alkoholwirkung.

Von den beliebig mit Wasser mischbaren Alkoholen erweist sich in unseren Versuchen der n-Propyl-Alkohol am wirksamsten, es folgen Isopropyl-, Aethyl-, Methyl-Alkohol; d. h. die bactericide Wirkung der geprüften Alkohole nimmt mit der Anzahl der C-Atome zu. Dasselbe Resultat erhielten andere Autoren auf Grund verschiedener Versuchsanordnungen (*Wirgin* 1904; *Tilley und Schaffner* 1926; *Tanner und Wilson* 1943). *Tilley und Schaffner* (1926) stellten außerdem fest, daß die Iso-Form der Alkohole weniger wirksam ist als die Normal-Form, was wir bei unseren Propylalkohol-Versuchen bestätigen konnten (vgl. Abb. 2 und 3).

Die *höheren Alkohole* sind nur noch sehr beschränkt mit Wasser mischbar, weshalb ein Vergleich mit den niedrigen Alkoholen schwierig ist. Butyl- und Amyl-Alkohol in sehr niedrigen Konzentrationen sind besser wirksam als n-Propyl-Alkohol in den entsprechenden Konzentrationen: beim 5%igen n-Propylalkohol tritt ungehemmtes Wachstum auf (Abb. 3), geschrumpfte Protoplasmastäbchen kommen nur noch vereinzelt vor (Abb. 2). Der 5%ige Butylalkohol hemmt jedoch das Wachstum vollständig, und phasenoptisch sind vorwiegend Stäbchen zu beobachten. 2%iger Amylalkohol ist seinerseits wirksamer als 2%iger Butylalkohol.

Beeinflussung der Alkoholwirkung durch verschieden lange Inkubationszeiten

Der Einfluß verschieden langer Inkubationszeiten von Bac. M mit Alkoholen wird am Beispiel des Aethylalkohols dargelegt. Die Ergebnisse finden sich in Tab. I. Mit Methyl-, n-Propyl- und Isopropyl-Alkohol erhielten wir prinzipiell dieselben Resultate: *mit Verlängerung der Inkubationszeit nimmt die bactericide Wirkung der Alkohole zu,* was sowohl mit der «Lysozym-Methode» als auch mit der Wachstumskontrolle zu sehen ist (Tab. I). Bei Anwendung der «Lysozym-Methode» ist es nicht möglich, sehr kurze Einwirkungszeiten (weniger als 10 min) zu prüfen, da der Zellwandabbau durch Lysozym nur in gewissen Suspensionsmedien (z. B. Ringer-, gepufferte, hypertonische Saccharoselösung) ungestört vor sich geht. Aus diesem Grunde muß das Desinfektionsmittel erst abzentrifugiert werden, um die Bakterien in einem geeigneten Medium suspendieren zu können.

Tab. I zeigt, daß beim 99,5- und 95%igen Alkohol gelegentlich vereinzelte, phasenoptisch leere Protoplasmakugeln sowie im

Wachstumsversuch 1–2 Kolonien zu finden sind. Die auch heute noch oft vertretene Meinung, Aethylalkohol 99,5% oder 95% sei ein «schlechteres Antisepictum» als der 70%ige Alkohol, stammt aus dem letzten Jahrundert. Die übliche Testmethode für Desinfektionsmittel bestand damals darin, auf Seidenfäden *getrocknete Bakterien* (*Koch* 1881) dem Desinfektionsmittel auszusetzen und nachher in Bouillon auf Wachstum zu prüfen. Während in diesem Modellversuch das Wachstum der Bakterien durch 70%-igen Alkohol gehemmt wird, tritt nach Behandlung mit 99,5- bis 95%igem Alkohol (bzw. bis 80% bei einer Inkubationszeit von nur 5 min) tatsächlich Wachstum auf. Hingegen werden Bakterien auf *feuchten Fäden* durch alle hohen Alkoholkonzentrationen, inkl. 99,5%, abgetötet (*Harrington und Walker* 1903). Dieses Phänomen beruht auf der Tatsache, daß die antibakterielle Wirkung der Alkohole v. a. durch Denaturierung der Proteine bedingt ist. Proteine werden in Anwesenheit von Wasser viel leichter denaturiert als in wasserfreiem Milieu. In unserem Falle (wir geben den Alkohol zu einem «feuchten» Bakteriensediment) dürfte es sich beim Auftreten vereinzelter leerer Protoplasmakugeln, bzw. Wachstum von 1–2 Kolonien beim 99,5- bis 95%igen Alkohol nicht um die sogenannte weniger bactericide Wirkung dieser Alkoholkonzentrationen handeln, sondern um die bei Zugabe dieser Alkoholkonzentrationen regelmäßig auftretende, auch durch mehrfaches Aufschütteln nicht zu vermeidende *Verklumpung der Bakterien.* Die im Innern des Bakterienkonglutinates liegenden Bakterien können vom Alkohol nicht angegriffen und infolgedessen nicht abgetötet werden.

Proteinfällungs-Versuche

Da die bactericide Wirkung der Alkohole vor allem auf Denaturierung der Protoplasmaproteine beruht, ist es interessant festzustellen, inwieweit die Protein ausfällende Wirkung der Alkohole der bactericiden Wirkung parallel geht. Als Eiweißquelle wählten wir aus frischem Rinderblut gewonnenes Serum. Die durch die verschiedenen Alkohole ausgefällte Proteinmenge wurde mit folgenden Methoden bestimmt:

1. *Gewichtsbestimmung des Niederschlages:* Je 3 ml unverdünntes Rinderserum wurden mit 3 ml des zu prüfenden Alkohols (in allen verwendeten Konzentrationen) in einem Zentrifugiergläschen gemischt, mit Zapfen verschlossen

TABELLE I

Verschiedene Inkubationszeiten von Bac. M mit Äthylalkohol

% Alkohol	Phasenoptisches Bild									Wachstum auf Agar		
	% Stäbchen			% leere Kugeln			% volle Kugeln					
Inkubationszeit	5′	30′	24 Std.	5′	30′	24 Std.	5′	30′	24 Std.	5′	30′	24 Std.
99,5	99,9	99,9	100	0,1	0,1	—	—	—	—	—[1]	—	—
95	99,9	99,9	100	0,1	0,1	—	—	—	—	—[1]	—	—
90–70	100	100	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—
60	70	92	100	30	8	—	—	—	—	—	—	—
50	60	70	95	40	30	5	—	—	—	—	—	—
40	25	65	70	65	35	30	10	—	—	0–1[2]	—	—
30	3	5	50	50	50	30	47	45	20	+	80[2]	1[2]
20	1	1	20	5	10	40	94	89	40	++	++	3[2]
10	—	—	1	—	—	40	100	100	59	+++	+++	++
5	—	—	0,1	—	—	10	100	100	90	+++	+++	¬ ¬ ¬

[1] selten eine Kolonie [2] Koloniezahl + 100–1000 Kolonien ++ mehr als 1000 Kolonien +++ Bakterienrasen

und bei 4° C 16—20 Std. stehen gelassen. Der entstehende Niederschlag wurde, nach Abzentrifugieren der überstehenden Flüssigkeit, während 3—5 Tagen im Vacuum (unter Zusatz von P_2O_5) bei 25° C getrocknet. Erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen keine Gewichtsabnahme mehr, wurde die Niederschlagsmenge aus der Gewichtszunahme der Zentrifugiergläschen ermittelt. Abb. 4 stellt das Ergebnis aus 3 Versuchen mit je mehrfachen Wägungen dar.

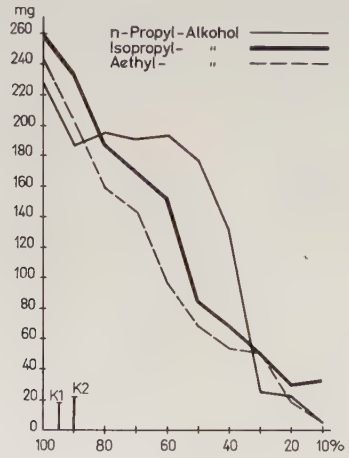


Abb. 4. Protein-Ausfällung durch Alkohole, Niederschlagsmenge gewogen. Ordinate: Niederschlagsmenge in mg. K_1, K_2: Kontrollen (3 ml Serum + 3 ml aqua dest.).

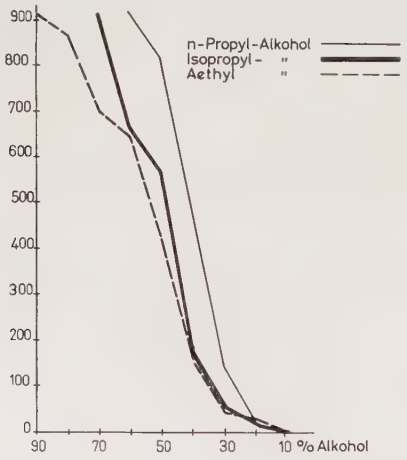


Abb. 5. Protein-Ausfällung durch Alkohole. Niederschlagsmenge mit Klett-Summerson-photoelektrischem Kolorimeter gemessen (Braunfilter Nr. 59). Ordinate: Klett-Summerson-Kolorimeter-Wert.

2. *Nephelometrische Bestimmung der Niederschlagsmenge* mit Hilfe eines Klett-Summerson photoelektrischen Kolorimeters. Das Verhältnis von 3 ml Serum zu 2 ml Alkohol ergab die für diese Bestimmung geeignetste Niederschlagsmenge. Die entstehende Trübung wurde unter Verwendung eines Braunfilters (Nr. 59) nephelometrisch gemessen; als Kontrolle diente 3 ml Serum + 2 ml aqua dest. Die Kurven in Abb. 5 stellen Mittelwerte aus 2 Versuchen mit je mehrfachen Messungen dar. Bei 90- und 100%igen Alkoholen entstanden zu große Niederschläge, so daß sie nephelometrisch nicht gemessen werden konnten.

Die turbidimetrische Messung (Abb. 5) des Niederschlages ergab große Schwankungen der einzelnen Werte. Eine geringere Streuung konnte mit der Wägungsmethode (Abb. 4) erzielt werden. Die bei 100- bis 90%igem Alkohol gefundenen Niederschlagsmengen sind nicht zuverlässig, da bei diesen Konzentrationen infolge grober Ausflockung keine klare überstehende Flüssigkeit erhalten werden konnte und deshalb beim Abgießen Verluste von ausgefällten Proteinen entstanden. Die Niederschlagsmengen, welche von 10- bis 30%igem Alkohol ausgefällt werden, sind sehr klein und deshalb mit allen Methoden schwierig zu beurteilen.

Im Bereich der gut beurteilbaren Niederschlagsmengen (80 bis 40% Alkohol) *präzipitiert der n-Propyl-Alkohol die größte Menge Proteine, es folgen Isopropyl-, Aethyl-Alkohol.* Dieses Ergebnis *stimmt mit dem Grad der bactericiden Wirkung überein.*

Diskussion

Obschon die Alkohole mehr als alle anderen Desinfektionsmittelgruppen studiert wurden, ist man weit davon entfernt, ihre Wirkung genau zu verstehen.

Die antibakterielle Wirkung der Alkohole wird allgemein durch *Denaturierung der Proteine* erklärt. Diese Annahme wird durch folgende Beobachtungen unterstützt:

1. Absoluter Aethyl-Alkohol wirkt in wasserfreiem Milieu weniger bactericid als mit Wasser verdünnter Aethyl-Alkohol, was zu der bekannten Tatsache paßt, daß Proteine in Abwesenheit von Wasser weniger leicht denaturiert werden.

2. *Sykes* (1939) konnte nachweisen, daß Alkohol die Bakterien-Dehydrogenase zerstört.

3. *Dagley* et al. (1950) stellten fest, daß die durch sehr niedrige Aethyl-Alkoholkonzentrationen (0,41 molar) bedingte verlängerte Latenzphase von Aerobacter aerogenes bei Zusatz gewisser Amino-

säuren nicht zustande kommt. Nach diesen Autoren hemmt Aethyl-Alkohol — über Denaturierung der in Enzymsystemen vorhandenen Proteine — die Bildung der für rasche Zellteilung wichtigen Metabolite.

4. In eigenen Versuchen ging die bactericide Wirkung der getesteten Alkohole ihrem Serumprotein-Fällungsvermögen parallel.

Unsere morphologischen Beobachtungen bestätigen diese Auffassung ebenfalls: Nach Einwirkenlassen verschiedener Alkohole auf Bac. M ergaben sich nach Abbau der Zellwand mit Lysozym, parallel zur Abnahme der Alkoholkonzentration, phasenoptisch [1] folgende Protoplasmaformen: geschrumpfte Protoplasmastäbchen — phasenoptisch leere, von der Protoplasmamembran begrenzte Kugeln — dunkle, volle Protoplasmakugeln (= Protoplasten). Wie lassen sich diese Protoplasmaformen deuten?

[1] Phasenoptische Beurteilung des Protoplasmas nach Abbau der Zellwand durch Lysozym wird als «Lysozym-Methode» bezeichnet.

Abb. 6—10. Phasenkontrast-Aufnahmen von in Ringerlösung suspendiertem Bac. M, 1500 : 1, Nachvergrößerung auf 3750 : 1.

Abb. 6. Bac. M, 24stündige Agarkultur, suspendiert in Ringerlösung. Vor Lysozymzugabe. Bac. M bildet kurze Ketten.

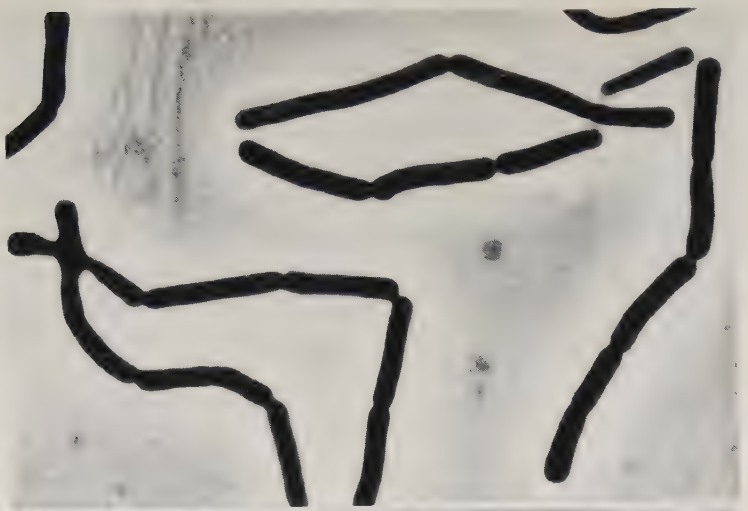
Abb. 7—10. Lysozym-Einwirkung (50 Gamma/ml) auf mit Aethyl-Alkohol (während 10 Min.) vorbehandelten Bac. M.

Abb 7. Abbau der Zellwand durch Lysozym nach Behandlung von Bac. M mit 30% Aethylalkohol. Status nach 10 Min.-Lysozym-Einwirkung: Das Cytoplasma löst sich von den Zellpolen; auch die Querwände werden abgebaut. Bei einem Zellelement (→) ist die sphärische Transformation des Protoplasmas nahezu vollendet. Die helleren Stäbchen weisen auf die Alkohol-bedingte, geringe Schädigung des Cytoplasmas hin.

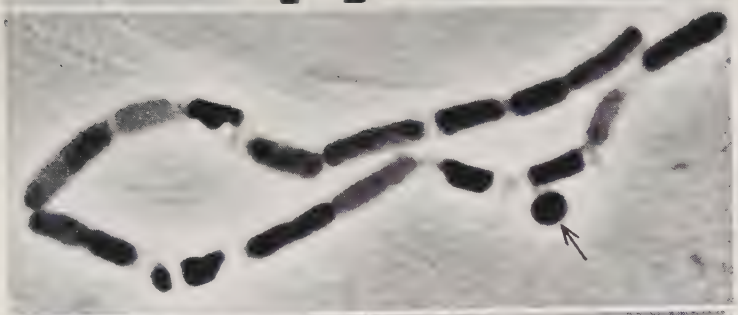
Abb. 8. Gleiche Versuchsbedingungen wie Abb. 7, jedoch 1/2 Std. Lysozym-Einwirkung: Status nach vollständigem Zellwandabbau. Phasenoptisch dunkle Kugel = intakter Protoplast (→); Zellform kurz vor Vollendung der sphärischen Transformation (➤).

Abb. 9. Gleiche Versuchsbedingungen wie Abb. 8. (→): phasenoptisch leere, von der Protoplasmamembran begrenzte Kugel: geringe Schädigung der Cytoplasmamembran.

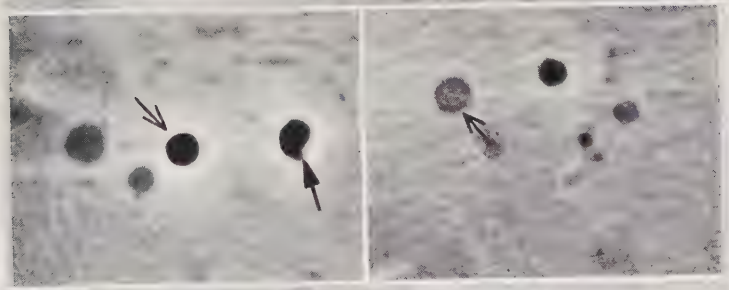
Abb. 10. Behandlung von Bac. M mit 90% Aethylalkohol. Status nach 1/2 Std. Lysozym-Einwirkung. Geschrumpfte Protoplasmastäbchen: Cytoplasmakoagulation.



6



7



8 9

10

Das Bild der phasenoptisch *dunklen, vollen Protoplasmakugeln* (*Protoplasten*), welches nach Zellwandabbau bei nicht mit Desinfektionsmitteln vorbehandelten Bac. M wie auch nach niedrigen Alkoholkonzentrationen beobachtet wird, entspricht einem intakten Protoplasma. Dies zeigen Versuche von *Weibull* (1953) und *McQuillen* (1955, 1956): *Weibull* wies nach, daß Protoplasten von Bac. megatherium in hypertonischer, gepufferter Saccharoselösung bei endogener Respiration wie auch während des Glucose-Metabolismus ebensoviel O_2 aufnehmen wie intakte Bac. megatherium. Verschiedene mit C^{14} markierte Substrate (Glukose, Glykokoll, Essigsäure, Asparagin-, Glutaminsäure, Adenin, Uracil) wurden von Protoplasten und intakten Zellen in gleicher Weise und im selben Ausmaß inkorporiert und metabolisiert (*McQuillen*).

Die *geschrumpften Protoplasmastäbchen* (von *Welshimer und Robinow* 1949 als «small bacilli» bezeichnet) entstehen nach Einwirkung von Hitze, Formol (*Welshimer und Robinow* 1949) und höheren Alkoholkonzentrationen. Infolge Proteinkoagulation im Cytoplasma kann eine sphärische Transformation des Protoplasmas nach Abbau der Zellwand nicht mehr stattfinden; das koagulierte Protoplasma behält seine ursprüngliche, durch die starre Zellwand bedingte Stäbchenform bei. Durch die Koagulation kommt es zu einer Schrumpfung des Protoplasmas, weshalb die Protoplasmastäbchen meist etwas kleiner sind als die intakten Stäbchen. Cytoplasmakoagulation bedeutet eine irreversible Schädigung des Bakteriums. Dementsprechend bleibt das Wachstum von Bac. M nach Alkoholkonzentrationen, die Protoplasmastäbchen hervorrufen, aus.

Währenddem man auf Grund der Wachstumskontrolle bei gewissen, etwas niedrigeren Alkoholkonzentrationen lediglich ausbleibendes Wachstum feststellen kann, gewinnt man mit der «Lysozym-Methode» einen etwas differenzierteren Einblick in den Grad der Bakterienschädigung: Neben Protoplasmakoagulation (Stäbchenformen) findet man Formen mit einer geringeren Läsion des Protoplasmas, nämlich phasenoptisch *leere, helle, von der Protoplasmamembran begrenzte Kugeln*. *Weibull* (1953) beschrieb solche leere Kugeln («empty spherical ghosts») nach längerer Lysozymeinwirkung auf intakte, in 0,03 molarer Phosphatpufferlösung suspendierte Bac. megatherium. Da in 0,2 molarer, gepufferter Saccharoselösung die Protoplasten viel länger intakt blieben, d. h. weniger schnell in «ghosts» übergingen, erklärte *Weibull*

(1953) die Entstehung von «ghosts» in hypotonen Suspensionsmedien bedingt durch die osmotische Labilität der Protoplasten.

Tomcsik (1955) beobachtete, daß sich Protoplasten in Ringer-Lösung gut konservieren lassen. Wir stellten eine ebenso gute Stabilität der Protoplasten in Ringer- wie in hypertonischer, gepufferter Saccharoselösung fest und erhielten in Parallelversuchen mit beiden Suspensionsmedien auch nach Anwendung von Desinfektionsmitteln identische Resultate. Daraus schließen wir, daß die leeren Protoplasmakugeln, welche nach Behandlung von Bac. M mit 30–60%igem Aethylalkohol auftreten, infolge einer Cytoplasmamembranschädigung und damit Permeabilitätsänderung entstehen. Protoplasmabestandteile, insbesondere Nukleinsäuren und Proteine (*Weibull* 1953) können ins Suspensionsmedium austreten, andererseits dringt Wasser vom Suspensionsmedium in die «leeren» Kugeln ein, weshalb diese meist auch beträchtlich größer sind als intakte Protoplasten und bei längerer Aufbewahrung im Suspensionsmedium platzen.

Die Zunahme der Alkohol-Wirksamkeit mit dem Molekulargewicht läßt auf einen Faktor schließen, der neben der Protein-Denaturierung bei der Wirkung der Alkohole eine Rolle spielen könnte: die Lipoidlöslichkeit der Alkohole. Für diese Hypothese sprechen auch Versuche von *Gilby und Few* (1960), in denen sie verschiedene Alkohole auf Protoplasten von Micrococcus lysodeicticus einwirken ließen. Es resultierte eine mit dem Molekulargewicht der Alkohole zunehmende Lysis der Protoplasten. Daraus folgerten *Gilby und Few* eine *Wirkung der Alkohole auf Lipoidkomponenten der Protoplasmamenbran.* Die dadurch bedingte Änderung der Membran-Permeabilität wäre somit die Voraussetzung für die Lysis der Protoplasten.

Wie Untersuchungen von *Crathorn und Hunter* (1958) zeigten, vermag eine von Protoplasten auf osmotischem Wege gewonnene und isolierte Membranfraktion noch radioaktive Aminosäuren zu inkorporieren. Diese Beobachtung sowie die Kugelform von «ghosts» weisen auf eine nur geringe Läsion der Protoplasmamembran bei den «leeren» Kugeln hin.

Wir haben gezeigt, daß die «Lysozym-Methode» gewisse Rückschlüsse auf Wirkungsmechanismen der Alkohole ermöglicht. In der Folge interessierte es uns, ob sich die «Lysozym-Methode»

auch bei der Beurteilung ganz anders wirkender Desinfektionsmittel (Sublimat, Jod) bewähre (im Druck).

Die Nachteile der «Lysozym-Methode» bestehen darin, daß lediglich Lysozym-empfindliche Bakterien untersucht werden können, und daß der Zellwandabbau durch Lysozym nur in bestimmten Suspensionsmedien ungestört abläuft. Da das Desinfektionsmittel aus diesem Grunde vor der Lysozym-Zugabe abzentrifugiert und ausgewaschen werden muß, ist es unmöglich, sehr kurze Desinfektionsmittel-Einwirkungszeiten (d.h. weniger als 10 Min.) zu untersuchen.

Die phasenoptische Betrachtung des zellwandfreien Protoplasmas erlaubt jedoch eine differenziertere und schnellere Beurteilung des Grades der Bakterienschädigung als die bloße Wachstumskontrolle. In kurzer Zeit (45–60 Min.) läßt sich die Wirkung eines Desinfektionsmittels quantitativ einschätzen.

Zusammenfassung

Nach Einwirkenlassen verschiedener Alkohole auf Bac. M sind nach Abbau der Zellwand durch Lysozym, mit Zunahme der bactericiden Wirkung, folgende Protoplasmaformen festzustellen:

1. Intakte, phasenoptisch dunkle, volle Kugeln (= Protoplasten); entsprechen fehlender Alkoholwirkung.

2. Phasenoptisch helle, leere, von der Protoplasmamembran begrenzte Kugeln; bedingt durch Veränderung der Cytoplasma-Membran-Permeabilität.

3. Geschrumpfte, phasenoptisch dunkle Protoplasmastäbchen; entstehen durch Cytoplasmakoagulation.

Ein Vergleich mit der Wachstumskontrolle ergibt bei 1. ungehemmtes, bei 2. und 3. fehlendes Wachstum.

Die phasenoptische Betrachtung des zellwandfreien Protoplasmas («Lysozym-Methode») ermöglicht einen differenzierteren Einblick in den Grad der Bakterienschädigung als die bloße Wachstumskontrolle und erlaubt gewisse Rückschlüsse auf Wirkungsmechanismen der Alkohole.

Summary

After exposure of Bac. M to various alcohols and subsequent decomposition of the cell wall with lysozyme, with increasing bactericidal action the following protoplasmatic forms were found by phase-contrast:

1. Intact, dense, filled spheres (= protoplasts); corresponding to lack of alcohol effect.

2. Light, empty spheres surrounded by the protoplasmatic membrane; caused by change in permeability of the cytoplasmatic membrane.

3. Shrunken, dense protoplasmatic rods; caused by coagulation of the cytoplasm.

Comparative determinations of rate of growth shows ad (1) no inhibition, ad (2) and ad (3) lack of growth.

Phase-contrast examination of protoplasm free of the cell wall ("lysozyme-method") leads to a more refined understanding of the degree of bacterial damage than a simple control of growth rate and allows certain conclusions as to the mechanisms of action of alcohols.

Résumé

Après le traitement du Bac. M par divers alcools suivi de la digestion de la paroi cellulaire par le lysozyme, on constate, parallèlement à l'augmentation de l'effet bactéricide, les transformations suivantes du protoplasme :

1° Boules pleines (protoplastes), intactes, sombres en contraste de phase ; correspondant à l'absence d'action de l'alcool.

2° Boules claires en contraste de phase, vides, délimitées par la membrane protoplasmique ; transformation due au changement de perméabilité de la membrane cytoplasmique.

3° Bâtonnets protoplasmiques ratatinés, sombres en contraste de phase, issus de phénomènes de coagulation cytoplasmique.

Des contrôles de croissance montrèrent que seule la phase 1° était viable.

L'observation en contraste de phase des protoplasmes privés de paroi cellulaire (méthode au lysozyme) permit une différenciation des degrés de lésions bactériennes plus nuancée que le simple contrôle de croissance et l'élaboration de quelques hypothèses sur le mécanisme d'action des alcools.

Literatur

1. *Brenner, S.; Dark, F. A.; Gerhardt, P.; Jeynes, M. H.; Kandler, O.; Kellenberger, E.; Klieneberger-Nobel, E.; McQuillen, K.; Rubio-Huertos, M.; Salton, M. R. J.; Strange, R. E.; Tomcsik, J.* and *Weibull, C.:* Bacterial protoplasts. Nature, Lond. *181:* 1713-1715 (1958).
2. *Crathorn, A. R.* and *Hunter, G. D.:* The site of protein synthesis in *Bacillus megatherium.* Biochem. J. *68:* 4 P (1958).
3. *Dagley, S.; Dawes, E. A.* and *Morrison, G. A.:* Inhibition of growth of *Aeorobacter aerogenes:* The mode of action of phenols, alcohols, acetone, and ethyl acetate. J. Bact. *60:* 369-379 (1950).
4. *Dyar, M. T.:* A cell wall stain employing a cationic surface-active agent as a mordant. J. Bact. *53:* 498 (1947).
5. *Gale, A. R.* and *Taylor, E. S.:* The action of tyrocidin and some detergent substances in releasing amino-acids from the internal environment of *Streptococcus faecalis.* J. gen. Microbiol. *1:* 77-84 (1947).
6. *Gilby, A. R.* and *Few, A. V.:* Lysis of protoplasts of *Micrococcus lysodeikticus* by alcohols. J. gen. Microbiol. *23:* 27-33 (1960).
7. *Harrington, C.* and *Walker, H.:* The germicidal action of alcohol. Boston Med. Surg. J. *148:* 548-552 (1903).

8. *Hugo, W. B.:* The mode of action of antiseptics. J. Pharm. Pharmacol. *9:* 145-161 (1957).
9. *Koch, R.:* Untersuchungen von pathogenen Organismen. Mitth. a. d. k. Gesamte *1:* 1 (1881).
10. *Knox, W. E.; Auerbach, V. H.; Zarudnaya, K.* and *Spirtes, M.:* The action of cationic detergents on bacteria and bacterial enzymes. J. Bact. *58:* 443-452 (1949).
11. *McQuillen, K.:* Bacterial protoplasts. I. Protein and nucleic acid metabolism in protoplasts of *Bacillus megatherium*. Biochim. et Biophys. Acta *17:* 382-390 (1955).
12. *McQuillen, K.:* Capabilities of bacterial protoplasts. Symp. Soc. Gen. Microbiol. *6:* 127-149 (1956).
13. *McQuillen, K.:* Bacterial protoplasts, in: The Bacteria, I. Structure (Academic Press, New York/London 1960).
14. *Mitchell, P. D.* and *Crowe, G. R.:* A note on electron micrographs of normal and tyrocidin-lysed streptococci. J. gen. Microbiol. *1:* 85 (1947).
15. *Rahn, O.* and *van Eseltine, W. P.:* Quaternary ammonium compounds. Ann. Rev. Microbiol. *1:* 173-192 (1947).
16. *Reddish, G. F.:* Antiseptics, disinfectants, fungicides and chemical and physical sterilization (Henry Kimpton, London 1957).
17. *Robertson, P. S.* and *Oliver, W. H.:* The supposed heat stability of some bacterial enzymes: a correction. J. gen. Microbiol. *11:* 130 (1954).
18. *Salton, M. R. J.:* The adsorption of Cetyltrimethylammonium bromide by bacteria, its action in releasing cellular constituents and its bactericidal effects. J. gen. Microbiol. *5:* 391-404 (1951).
19. *Salton, M. R. J.; Horne, R. W.* and *Cosslett, V. E.:* Electron microscopy of bacteria treated with Cetyltrimethylammonium bromide. J. gen. Microbiol. *5:* 405-407 (1951).
20. *Salton, M. R. J.:* Cell structure and the enzymic lysis of bacteria. J. gen. Microbiol. *9:* 512-523 (1953).
21. *Stedman, R. L.; Kravitz, E.* and *King, J. D.:* Studies on cell surface-germicide and enzyme-germicide reactions and their contribution to the lethal effect. J. Bact. *73:* 655-660 (1957).
22. *Sykes, G.:* The influence of germicides on the dehydrogenases of *Bact. coli*. Part I: The succinic acid dehydrogenase of Bact. coli. J. Hyg Camb. *39:* 463-469 (1939).
23. *Sykes, G.:* Desinfection and Sterilization (E. & F. N. Spon, Ltd., London 1958).
24. *Tanner, F. W.* and *Wilson, F. L.:* The germicidal action of alcohol. Proc. Soc. exptl. Biol. & Med. *52:* 138-140 (1943).
25. *Tilley, F. W.* and *Schaffner, J. M.:* Relation between the chemical constitution and germicidal activity of the monohydric alcohols and phenols. J. Bact. *12:* 303-309 (1926).
26. *Tomcsik, J.:* Zur Frage der induzierten Mutation der Milzbrandbazillen. Schweiz. Z. Path. Bakt. *12:* 489-499 (1949).
27. *Tomcsik, J.:* Induced mutation of *Bacillus anthracis*. J. gen. Microbiol. *4:* XVI (1950).

28. *Tomcsik, J.:* Über eine bewegliche Mutante des *Bac. anthracis.* Schweiz. Z. Path. Bakt. *13:* 616-624 (1950).
29. *Tomcsik, J.* und *Guex-Holzer, S.:* Änderung der Struktur der Bakterienzelle im Verlauf der Lysozym-Einwirkung. Schweiz. Z. Path. Bakt. *15:* 517-525 (1952).
30. *Tomcsik, J.:* Effect of disinfectants and of surface active agents on bacterial protoplasts. Proc. Soc. exp. Biol. Med. *89:* 459-463 (1955).
31. *Weibull, C.:* The isolation of protoplasts from *Bac. megatherium* by controlled treatment with lysozyme. J. Bact. *66:* 688-695 (1953).
32. *Welshimer, H. J.* and *Robinow, C. F.:* The lysis of *Bac. megatherium* by lysozyme. J. Bact. *57:* 489-499 (1949).
33. *Wirgin, G.:* Vergleichende Untersuchungen über die keimtötenden und die entwicklungshemmenden Wirkungen von Alkoholen der Methyl-, Aethyl-, Propyl-, Butyl- und Amylreihen. Z. Hyg. InfektKr. *46:* 149-168 (1904).
34. *Zapf, K.:* Über den Effekt von Aethylpyridiniumchlorid und -bromid auf zellwandfreie Protoplasten lysozymempfindlicher Bakterien. Zbl. Bakt. (I. Abt. Orig.) *183:* 45-57 (1961).